世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2007年1月8日; 15(1): 39-45
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

临床研究 CLINICAL RESEARCH

# 肝癌组织巨噬细胞移动抑制因子的表达及对肿瘤细胞增殖和血管形成的影响

关泉林, 于晓辉, 霍永忠, 李 波

关泉林, 兰州大学第一医院肿瘤外科 甘肃省兰州市 730000
于晓辉, 兰州军区兰州总医院消化科 甘肃省兰州市 730030
霍永忠, 广东省中医院普外科 广东省广州市 510120
李波, 四川大学华西医院普外科 四川省成都市 610041
关泉林, 2005年四川大学临床医学博士, 副教授, 主要从事消化道肿瘤的基础与临床研究.
**通讯作者**: 李波, 610041, 四川省成都市外南国学巷37号, 四川大学华西医院普外科. cdlibo@medmail.com
收稿日期: 2006-04-08 接受日期: 2006-04-29

## Expression of macrophage migration inhibitory factor and its effect on cell proliferation and angiogenesis in human liver cancer

Quan-Lin Guan, Xiao-Hui Yu, Yong-Zhong Huo, Bo Li

Quan-Lin Guan, Department of Tumor Surgery, the First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu Province, China
Xiao-Hui Yu, Department of Gastroenterology, Lanzhou General Hospital of Lanzhou Military Command, Lanzhou 730030, Gansu Province, China
Yong-Zhong Huo, Department of General Surgery, Guangdong Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510120, Guangdong Province, China
Bo Li, Department of General Surgery, West China Hospital, Sichuan University, Chendu 610041, Sichuan Province, China
Correspondence to: Bo Li, Department of General Surgery, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China. cdlibo@medmail.com
Received: 2006-04-08 Accepted: 2006-04-29

## Abstract

**AIM:** To determine the expression of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in hepatocellular carcinoma (HCC) and its effect on cell proliferation and angiogenesis.

**METHODS:** The protein expression of MIF, interleukin-8 (IL-8), and vascular endothelial factor (VEGF) as well as microvessel density (MVD) were examined by immunochemistry in HCC tissues ($n$ = 40), cancer-adjacent liver tissues ($n$ = 40) and normal liver tissues ($n$ = 10). At the same time, real time quantitative polymerase chain reaction (RQ-PCR) was used to detect the mRNA levels of MIF, VEGF and IL-8. After human hepatocarcinama cell line Bel-7402 was treated with recombinant MIF (rMIF), cell proliferation was detected by MTT assay and the secretion levels and mRNA expression of VEGF and IL-8 were examined by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and RQ-PCR, respectively.

**RESULTS:** The positive rates of MIF, IL-8 and VEGF in HCC tissues were significantly higher than those in normal liver tissues (72.5% *vs* 30.0%, 67.5% *vs* 20.0%, 62.5% *vs* 30.0%, all $P < 0.01$). The expression of MIF and IL-8 were markedly correlated with VEGF expression ($r = 0.271$, $P < 0.05$) and MVD ($r = 0.284$, $P < 0.05$). VEGF concentration in the supernatant of Bel-7402 cells was higher (900.00 ± 264.58 ng/L) than that in the controls (180 ± 50 ng/L) at the 24$^{th}$ hour after rMIF treatment ($P < 0.01$). However, there was no significant variation in IL-8 concentration ($P > 0.05$). The post-treatment level of VEGF mRNA was 6.86 times as high as that without treatment ($P < 0.05$), and there was no significant change in IL-8 mRNA expression ($P > 0.05$).

**CONCLUSION:** The over-expression of MIF plays a crucial role in the angiogenesis of liver cancer and the roles of MIF and IL-8 may be realized via VEGF.

Key Words: Liver cancer; Macrophage migration inhibitory factor; Vascular endothelial factor; Interleukin-8; Microvessel density; Immunochemistry; Real time quantitative polymerase chain reaction

Guan QL, Yu XH, Huo YZ, Li B. Expression of macrophage migration inhibitory factor and its effect on cell proliferation and angiogenesis in human liver cancer. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(1):39-45

## 摘要

**目的:** 研究巨噬细胞移动抑制因子(MIF)在原发性肝癌中的表达及对肝癌细胞增殖和血管形成的影响.

**■背景资料**
原发性肝癌(PLC)的高转移性和高复发性是影响其预后的主要因素. 深入研究原发性肝癌,包括肝细胞性肝癌(HCC)的转移复发机制和积极探索有效的抗复发治疗措施等是当前原发性肝癌诊治中的重点和难点. 最新的研究表明, 肝癌的生长和代谢需要持续的血管生成; 肝癌的血管新生化与其生长、浸润转移、分期及预后有着密切联系, 探索原发性肝癌血管新生化的机制及抗血管生成策略是肝癌基础与临床研究领域的新热点.

■研发前沿
肿瘤血管形成受正负调节因子的调节, 正调节因子主要包括: VEGF, bFGF, pIGF等, 他们起刺激和启动血管形成的作用. 负调节因子包括各种抑素. VEGF是作用最强、最重要的促血管内皮细胞生长因子, 近几年针对EGFR, VEGF的靶向治疗已取得喜人的疗效, 但仍有其局限性, 多靶点治疗是将来发展的方向.

**方法**: 免疫组化法检测40例肝癌、癌旁组织和10例正常肝组织中MVD及MIF, IL-8和VEGF蛋白的表达情况, RQ-PCR检测MIF, IL-8和VEGF的mRNA表达水平. MTT法检测人重组MIF(rMIF)对Bel-7402肝癌细胞株增殖的影响, 酶联免疫吸附试验(ELISA)和实时定量聚合酶链反应(RQ-PCR)检测VEGF和IL-8的分泌和mRNA的表达.

**结果**: MIF, VEGF和IL-8在肝癌组织中均高表达(72.5%, 67.5%, 62.5%), 经$\chi^2$检验, 与正常组织相比(30.0%, 20.0%, 30.0%), 差异具有显著性($P$<0.01). MIF和IL-8的表达与VEGF的表达呈正相关($r$ = 0.271, $P$<0.05), 并且与MVD显著相关($r$ = 0.284, $P$<0.05). rMIF和Bel-7402共培养24 h后, 上清中VEGF含量为900±265 ng/L, 对照组为180±50 ng/L($P$<0.01), 而IL-8含量改变无明显的变化($P$>0.05); 实验组肝癌细胞株VEGF mRNA表达量是对照组的6.86倍($P$<0.05); 而IL-8 mRNA是对照组的1.23倍($P$>0.05).

**结论**: MIF是一种血管生成因子, MIF和IL-8的参与肿瘤血管形成有可能是通过VEGF发挥作用.

**关键词: 肝癌; 巨噬细胞移动抑制因子; 血管内皮生长因子; 白细胞介素-8; 微血管密度; 免疫组织化学; 实时定量聚合酶链反应**

关泉林, 于晓辉, 霍永忠, 李波. 肝癌组织巨噬细胞移动抑制因子的表达及对肿瘤细胞增殖和血管形成的影响. 世界华人消化杂志 2007;15(1):39-45
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/39.asp

## 0 引言

巨噬细胞移动抑制因子(macrophage migration inhibitory factor, MIF)是一种来源于活化T淋巴细胞和巨噬细胞的细胞因子, 在机体的炎症反应中起炎症介质的作用. 近年来, 研究发现, MIF在有些肿瘤发展和演进的过程中也起非常重要的作用, 他可能涉及肿瘤细胞的分化、增殖及肿瘤血管的生成, 抑制肿瘤细胞的凋亡. 由于目前尚未发现MIF的受体分子, 因而还不了解MIF促进肿瘤细胞信号传导的作用机制, 他可能涉及肿瘤细胞的分化、增殖及肿瘤血管的生成, 抑制肿瘤细胞的凋亡. 并且, 在一些癌前病变中也呈高表达, 提示MIF有可能成为一种肿瘤标记物和预测肿瘤发生的检测指标. 有文献报道MIF可明显上调IL-8, TGF-β和VEGF, 提示MIF可能是通过上调这些血管生长因子, 促进肿瘤微血管的形成, 以实现肿瘤细胞的恶性增殖. MIF在原发性肝癌的作用报道较少, 我们探讨了MIF在肝癌发生、发展及血管生成中的意义.

## 1 材料和方法

1.1 材料 2004-04/12新鲜的原发性肝癌及癌旁组织标本40例, 男33例, 女7例, 年龄27-75(中位51.5)岁. 以上标本均术中取材, 取一小部分立即液氮保存, 然后在-80℃冰箱冻存; 并取10例正常肝组织(肝移植的供肝无乙肝、丙肝等肝病背景)为对照, 余肝癌组织送病理科行常规病理组织学检查, 所有标本均经病理科确诊为肝癌. 所有患者术前未经介入、放射及射频等治疗. 查阅病历, 收集临床及病理组织学资料. TNM采用国际抗癌联盟(UICC)的分期方法及日本肝癌研究组进一步归纳将肝癌分为4期, 其中Ⅰ期1例, Ⅱ期15例, Ⅲ期14例和Ⅳ期11例. 肿瘤Edmondson分级: Ⅰ-Ⅱ级23例, Ⅲ-Ⅳ级17例; 伴有肝硬化33例; 合并门静脉癌栓11例; HBsAg阳性36例; 肿瘤直径≤5 cm 5例, >5 cm 25例, 多发10例; AFP≥400 μg/L者24例, <400 μg/L者16例. 肝细胞癌37例, 为混合性肝癌2例, 腺癌1例. 人肝癌细胞系Bel-7402细胞由四川大学华西医院传染科实验室提供, 常规培养传代, 待细胞长满培养瓶底的70%-80%时备用. 免疫组织化学采用SABC法. MIF一抗采用鼠抗人MIF mAb(Santa Cruz), 工作浓度2 mg/L. VEGF一抗采用鼠抗人VEGF mAb(武汉博士德公司), 工作浓度4 mg/L. IL-8一抗采用鼠抗人IL-8 mAb(Santa Cruz), 工作浓度2 mg/L. CD34一抗采用鼠抗人CD34 mAb(武汉博士德公司), 工作浓度2 mg/L. 用PBS缓冲液替代各种第一抗体做为阴性对照. 人MIF的上下游引物及探针: 正义链: 5'-CTGCACAGCATCGGCAAGAT-3'; 反义链: 5'-AGTTGATGTAGACCCTGTCC-3'; TaqMan: 5'-CAGCAGGCCGCACAGCAGCTT-3'; 扩增产物片段为112 bp. 人VEGF的上下游引物及探针: 正义链: 5'-GCAGAATCATCACGAAGTGGT-3'; 反义链: 5'-TGAAGATGTACTCGATCTCATCA-3'; TaqMan: 5'-CCCTGGTGGACATCTTCCAGG-3'; 扩增产物片段为125 bp. 人IL-8的上下游引物及探针: 正义链: 5'-CAAACCTTTCCACCCCAAAT-3'; 反义链: 5'-CAAACCTTTCCACCCCAAAT-3'; TaqMan: 5'-CTCTGTCTGGACCCCAAGGA-3', 扩增产物片段为169 bp. 人GAPDH的上下游引物及探针:

正义链: 5'-GGGTGTGAACCATGAGAAGT-3'; 反义链: 5'-CCAAAGTTGTCATGGATGACCT-3'; TaqMan: 5'-CTGCACCACCAACTGCTTAGC-3'; 扩增产物片段为180 bp(大连宝生物).

1.2 方法

1.2.1 实时定量PCR 取-80℃冷冻保存的组织, 采用TRIzol试剂(美国MRC公司), 提取组织的总RNA, 按试剂盒操作说明操作. 提取的总RNA经10 g/L琼脂糖凝胶电泳结果, 可见28 S, 18 S, 5 S三条带, 无DNA污染条带, 无明显降解条带, 表明提取的总RNA纯度较高. RNA的逆转录采用RevertAid$^{TM}$ First Strand cDNA Synthesis Kit(立陶宛MBI公司), 按试剂盒操作说明操作. 将cDNA进行常规PCR扩增, 扩增条件(略), 常规PCR产物经15 g/L琼脂糖凝胶电泳, 目的条带清晰, 且没有杂带, 说明引物设计合成无误, 可以进行荧光定量PCR(FTC2000, 加拿大枫岭公司). 制定标准曲线, 扩增条件如下: 94℃ 1 min, 94℃ 10 s, 55℃ 30 s, 72℃ 1 min, 共45 cycles. 45循环的扩增反应结束后, 系统将采集到的每一循环反应时的各反应管的荧光强度增长指数(DRn)进行分析绘制每一反应管的扩增动力学曲线. 根据动力学曲线确定每个样品管中荧光强度增加到某一特定阈值时的扩增循环数(Ct值), 根据Ct值与标准模板初始拷贝的对数值作图, 得到该样品的标准曲线. 将逆转录得到的cDNA样品中各取5 μL, 加入和上面完全相同的反应体系中, 在同样的反应条件下行PCR扩增. 收集数据, 绘制动力学曲线, 测定各样品的Ct值与标准曲线进行比较, 得出待侧样品的相对拷贝数. 在PCR反应过程中, 设定无cDNA样品的空白管作为阴性对照. 依据参考文献的计算方法对荧光定量PCR所得数据计算相对拷贝数后行方差分析△△Ct = $(Ct_{肿瘤组织目的基因}-Ct_{GAPAH})_{实验组}-(Ct_{肿瘤组织目的基因}-Ct_{GAPAH})_{正常肝组织}$; 标化后的目的基因的相对表达比[1] = $1.9^{-\triangle\triangle Ct}$.

1.2.2 MTT比色试验 将肝癌细胞株Bel-7402稀释成0.5×$10^8$个/L, 以每孔200 μL接种于96孔板, 培养24 h待细胞贴壁后, 更换培养液. 各实验组加入不同浓度的人重组MIF(rMIF)(R&D System公司), 以不加药物组作为对照, 每组设3个复孔. 分别于加药后24, 48, 72 h, 加入MTT 20 μL, 继续培养4 h, 加入DMSO 150 μL震荡溶解10 min, 使结晶充分溶解. 空白对照调零, 选择595 nm波长在酶联免疫检测仪上, 测定各孔的光吸收值(*A*值), 以时间为横轴, *A*值为纵轴, 绘制细胞生长曲线.

1.2.3 酶联免疫吸附试验 在实验组中加入终浓度为200 μg/L的rMIF, 继续培养24 h, 吸取细胞培养上清500 μL, 12 000 *g*, 离心5 min以除去上清液中的细胞碎片. 每组设3个复孔. 人VEGF ELISA试剂盒和IL-8 ELISA试剂(武汉博士德生物公司), 按试剂盒操作说明操作. 用酶标仪在450 nm测定*A*值, 将TBM空白显色孔设为对照. 所有的标准品和样品的吸收值减去零孔的吸收值后, 在坐标纸上画出曲线, 以吸光值作为纵坐标, 以浓度作为横坐标. 另在实验组中加入终浓度为200 μg/L的rMIF, 共培养24 h, 收获细胞, 提取总RNA, 进行VEGF mRNA和IL-8 mRNA的RQ-PCR检测(引物序列、实验方法、步骤和计算统计方法同前).

**统计学处理** 结果以均数士标准差(mean士SD)表示, 采用SPSS 11.0统计软件进行分析, 相关变量采用方差分析, *t*检验, 相关性检验采用Pearson, $\chi^2$检验, $P<0.05$为差异有显著性标准.

## 2 结果

2.1 肝癌组织中MIF, VEGF和IL-8的表达 MIF在肝癌和癌旁组织及正常肝组织中的阳性表达率分别为72.5%, 90.0%和30.0%; VEGF的阳性表达率分别为67.5%, 87.5%和20.0%; IL-8的阳性表达率分别为62.5%, 82.5%和30.0%, 经$\chi^2$检验, 均具有统计学意义($P<0.01$). 以CD34标记的微血管密度(MVD)值在肝癌的组织中计数值范围为0-l6.71, 中位数为5.68. 经Pearson相关分析, 肝癌组织中MIF, VEGF和IL-8的表达与MVD具有相关关系($r = 0.284$, $P<0.05$). MIF和VEGF的表达与肿瘤的分化程度有关($P<0.05$); MIF和IL-8的表达同肿瘤有无包膜形成有关($P<0.05$), 而且IL-8的表达与肿瘤的大小有关($P<0.05$); 并且MIF和IL-8的表达与VEGF的表达呈正相关($r = 0.271$, $P<0.05$). 经RQ-PCR检测, MIF mRNA在肝癌和癌旁组织表达分别是正常肝组织的3.22和6.52倍, VEGF mRNA在肝癌和癌旁组织表达分别是正常肝组织3.78和4.64倍, IL-8 mRNA在肝癌和癌旁组织表达分别是正常肝组织3.39和5.62倍, 经*t*检验, 均具有统计学意义($P<0.05$)(表1).

2.2 rMIF对人肝癌细胞的影响 rMIF在50 μg/L组, 24 h对肝癌细胞的生长影响不明显($P>0.05$), 48 h后肝癌细胞的生长逐渐增加($P<0.05$), 随着浓度的增加和作用时间的延长, 肝癌细胞的生长明显增加, 在72 h最为显著, 肝细胞的生长

**■相关报道**

MIF不仅是免疫和炎症反应中必要成分, 也可在肿瘤细胞中表达, 并且与较差的预后和较高的肿瘤转移危险性密切相关, MIF在许多肿瘤中表达, 如淋巴瘤、前列腺癌、乳腺癌、结肠癌、肝和肺癌. 有实验证明MIF是诱导乳腺细胞增殖和抑制P53功能的关键的细胞因子. Benedetti发现IL-8像VEGF一样可显著刺激HDMEC增生, 说明IL-8在肿瘤细胞和内皮细胞的生长过程中起重要作用, IL-8和VEGF共同作用时可起协同效应, 使凋亡细胞的数量减少50%. 进一步通过细胞实验发现, MIF的刺激增强了癌细胞VEGF的分泌水平, 同时也上调了VEGF mRNA表达MIF在癌组织的高表达, 说明有可能促进肝癌细胞的增殖和血管形成, 有报道MIF与肝癌和胃癌的血管形成有关.

■创新盘点
肝癌的血管生成促进因子有多种, 如血管内皮生长因子(VEGF)、血小板源性生长因子(PDGE)、转化生长因子(TGF)、表皮细胞生长因子(EGF)、成纤维细胞生长因子(FGF)、肿瘤坏死因子(TNF)、血管趋化素、前列腺素$E_1$, $E_2$及胰岛素样生成因子等, 其中以VEGF作用最强. 肝癌血管生成促进因子与抑制因子以及他们之间的相互作用关系仍需进一步深入研究. 本文重点研究了MIF, IL-8和VEGF对肝癌中的作用及对血管形成的影响以及他们之间的相互作用.

表 1 原发性肝癌组织MIF, VEGF和IL-8的表达与部分临床病理特点的关系

| 项目 | n | MIF | | VEGF | | IL-8 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 蛋白 | mRNA | 蛋白 | mRNA | 蛋白 | mRNA |
| 性别 | | | | | | | |
| 男 | 33 | 22[a] | 3.65 ± 2.43 | 23 | 12.21 ± 1.89 | 22 | 5.00 ± 4.62 |
| 女 | 7 | 7 | 2.07 ± 1.02 | 4 | 12.57 ± 1.72 | 7 | 4.39 ± 3.70 |
| 年龄 | | | | | | | |
| ≥60 | 15 | 12 | 2.77 ± 2.06 | 10 | 12.13 ± 1.89 | 11 | 4.67 ± 2.61 |
| <60 | 25 | 17 | 3.74 ± 2.43 | 17 | 12.36 ± 1.85 | 18 | 4.40 ± 4.44 |
| 分化 | | | | | | | |
| Ⅰ－Ⅱ | 21 | 12[a] | 4.50 ± 2.64[a] | 9[a] | 13.05 ± 1.86[a] | 10 | 4.24 ± 2.74 |
| Ⅲ－Ⅳ | 19 | 17 | 2.13 ± 0.91 | 18 | 11.42 ± 1.44 | 17 | 4.79 ± 4.81 |
| 大小 | | | | | | | |
| ≤5 cm | 5 | 2 | 2.30 ± 0.98 | 4 | 11.10 ± 0.22 | 3 | 9.10 ± 5.73[a] |
| >5 cm | 25 | 20 | 3.22 ± 2.23 | 15 | 12.46 ± 1.91 | 16 | 3.70 ± 3.41 |
| 多发 | 10 | 5 | 4.30 ± 2.83 | 8 | 12.40 ± 2.01 | 7 | 4.20 ± 1.99 |
| 分期 | | | | | | | |
| Ⅰ | 1 | 0 | | 1 | | 0 | |
| Ⅱ | 15 | 9 | 3.73 ± 2.32 | 8 | 12.77 ± 1.80 | 7 | 4.77 ± 4.49 |
| Ⅲ | 14 | 12 | 2.53 ± 1.77 | 10 | 11.90 ± 1.93 | 11 | 3.87 ± 3.88 |
| Ⅳ | 11 | 8 | 4.22 ± 2.99 | 8 | 12.22 ± 1.86 | 9 | 4.39 ± 1.80 |
| 包膜 | | | | | | | |
| 有 | 12 | 6[a] | 3.65 ± 2.43 | 6 | 12.19 ± 1.44 | 7 | 6.27 ± 4.40[a] |
| 无 | 28 | 23 | 3.24 ± 2.30 | 21 | 12.32 ± 2.03 | 23 | 3.65 ± 3.26 |
| 癌栓 | | | | | | | |
| 有 | 11 | 8 | 3.40 ± 12.65 | 9 | 12.2 ± 31.66 | 7 | 3.77 ± 3.04 |
| 无 | 29 | 21 | 3.36 ± 2.23 | 18 | 12.29 ± 1.93 | 29 | 4.78 ± 4.09 |
| 肝硬化 | | | | | | | |
| 有 | 33 | 23 | 3.49 ± 2.42 | 22 | 12.46 ± 1.70 | 20 | 4.85 ± 4.03 |
| 无 | 7 | 6 | 2.86 ± 1.87 | 5 | 11.43 ± 2.37 | 5 | 2.86 ± 2.12 |
| AFP | | | | | | | |
| ≥400 mg/L | 26 | 16 | 3.79 ± 2.43[a] | 19 | 12.19 ± 1.53 | 17 | 5.21 ± 5.09 |
| <400 mg/L | 14 | 13 | 2.61 ± 1.95 | 8 | 12.43 ± 2.38 | 10 | 4.12 ± 2.98 |
| HBSAg | | | | | | | |
| 阳性 | 36 | 25 | 3.58 ± 2.35 | 23 | 12.39 ± 1.65 | 26 | 3.96 ± 0.66 |
| 阴性 | 4 | 4 | 1.50 ± 0.58 | 4 | 11.25 ± 3.30 | 3 | 2.36 ± 1.18 |

[a]$P$<0.05.

与对照组相比有显著的差异($P$<0.01). rMIF与Bel-7402肝癌细胞共24 h后, 培养上清中VEGF含量为900±265 ng/L, 对照组为180±50 ng/L, 经$t$检验, 具有统计学意义($P$<0.01); IL-8含量为39±22 ng/L, 对照组为47±34 ng/L, 经$t$检验, 无统计学意义($P$>0.05). rMIF刺激Bel-7402肝癌细胞24 h后, 经RQ-PCR检测, 实验组肝癌细胞VEGF mRNA表达是对照组的6.86倍($P$<0.05); IL-8 mRNA的表达是对照组的1.23倍($P$>0.05); 说明rMIF刺激后, 肝癌细胞VEGF mRNA表达上调, 而IL-8 mRNA的表达无明显变化.

## 3 讨论

MIF不仅是免疫和炎症反应中必要成分, 也可在肿瘤细胞中表达, 并且与较差的预后和较高的肿瘤转移危险性密切相关[2-3]. MIF在许多肿瘤中表达, 如淋巴瘤[4]、前列腺癌[5-6]、乳腺癌[7]、结肠癌[8]、肝[9]和肺癌[2]等. 我们的研究证实, MIF在肝癌组织和癌旁组织分别有72.5%和90.0%表达, 明显高于正常肝组织($P$<0.001); 肝癌组织和癌旁组织的mRNA分别是正常肝组织的3.22和6.52倍($P$<0.01), 肝癌组织MIF mRNA水平明显低于癌旁组织, 癌旁组织的MIF mRNA是癌组

织的2.03倍, 存在明显差异($P$<0.05), 这与肝癌的核酸代谢旺盛密切相关, 说明MIF有可能参与肿瘤的生长和增殖. MIF是一种炎症因子, 在促进各种炎性疾病的病理过程中, MIF促进细胞生长的特性是其重要的机制. 有实验证明MIF是诱导乳腺细胞增殖和抑制P53功能的关键的细胞因子[10]. MIF在癌组织的高表达, 并且与MVD相关, 说明有可能促进肝癌细胞的增殖和血管形成, 有报道MIF与肝癌和胃癌的血管形成有关[11-12].

VEGF主要由癌细胞产生, 并启动了肿瘤血管生长, 癌细胞可通过自分泌途径促进癌组织内血管的生成[13-14]. 已有VEGF能强烈诱导血管形成及刺激HCC复发转移的实验研究报告[15-16]. IL-8属于趋化因子CXC基因家族, 是一种多功能的细胞因子. 他在许多肿瘤中都表达, 如乳腺癌[17]、胃癌[18]、胰腺癌[19]和肝癌[20]. IL-8以旁分泌方式与白细胞和血管内皮细胞表面的CXCR受体结合, 促使白细胞趋化进入肿瘤组织和引起内皮细胞增殖形成新生血管, 从而加速肿瘤生长和转移[21]. 我们发现, 肝癌组织和癌旁组织VEGF和IL-8表达高于正常肝组织, 并且与MVD相关, 表明VEGF和IL-8有可能参与肝癌的增殖和血管形成. 我们还发现, MIF mRNA和IL-8 mRNA的表达与VEGF mRNA表达呈正相关($P$<0.05), 这说明MIF和IL-8参与肿瘤血管的形成有可能是通过VEGF实现的. 有实验发现, MIF在多形性成神经胶质细胞瘤明显高表达, 在体外实验发现, 缺氧和低血糖状态能明显上调MIF的表达和促进血管形成, 同时MIF的表达同VEGF的表达明显相关[22-23]. 肝癌细胞可以产生IL-8, 是肝癌的一种血管生成因子[24]. 我们的实验未证实MIF mRNA和IL-8 mRNA表达的相互关系. 肝癌的血管形成和增殖是多种细胞因子相互作用的结果, 从我们的实验可以说明MIF和IL-8上调肝癌细胞VEGF的表达, 二者协同作用, 促进血管的形成和肿瘤增殖.

Benedetti *et al*[25]发现IL-8像VEGF一样可显著刺激HDMEC增生, 说明IL-8在肿瘤细胞和内皮细胞的生长过程中起重要作用, IL-8和VEGF共同作用时可起协同效应, 使凋亡细胞的数量减少50%. 进一步通过细胞实验发现, MIF的刺激增强了癌细胞VEGF的分泌水平, 同时也上调了VEGF mRNA表达; 但是IL-8的分泌水平和mRNA的表达未见明显上调, 可能与这种肝癌细胞不分泌或者仅分泌极微量的IL-8, 或者是通过其他信号转导途径分泌其他细胞因子而发挥作用. 但也有文献报道, MIF能刺激肝癌细胞分泌IL-8, 促进肝癌细胞的侵袭和转移, 认为MIF与肝癌的转移和血管生成有关[13]. 肿瘤血管形成受正负调节因子的调节, 正调节因子主要包括: VEGF, bFGF, pIGF等, 他们起刺激和启动血管形成的作用. 负调节因子包括各种抑素. 近年来认为MIF是具有血管生成因子功能的炎症因子, 许多肿瘤血管生成前都有MIF的过表达, 因而对肿瘤细胞转移过程中的微血管形成具有重要的作用. MIF作用于肿瘤细胞表面的受体, 使其分泌VEGF, 从而促进血管内皮的形成. MIF还可以上调其他细胞因子的, 如TGF-β, PDGF的表达, 并与其共同作用促进肿瘤的增殖和血管的形成, Shimizu *et al*[26]采用背侧气囊技术在人黑色素瘤模型也证实MIF抗体对肿瘤血管形成的抑制作用, 说明MIF在肿瘤相关的血管形成中起着重要的作用[27]. Chesney *et al*[28]将同源的B淋巴细胞注入syngeneic小鼠体内, 观察在MIF多克隆中和抗体缺乏/存在的情况下肿瘤的生长情况, 结果发现, MIF的免疫中和抗体在肿瘤生长的初始阶段明显影响肿瘤生长的大小; 然后用反义核算技术抑制肿瘤形成部位MIF的形成, 取得了和MIF特异性抗体一样的抑瘤效果, 抑制MIF的反义核酸几乎完全抑制了肿瘤的生长. 进一步研究发现, MIF的中和抗体不是抑制肿瘤细胞的增殖, 而是抑制内皮细胞的生长. 说明MIF是内皮细胞增殖和肿瘤血管生成的必需因子.

我们研究MIF, VEGF和IL-8的表达与肝癌临床病理特点的关系, 结果表明, MIF和VEGF的表达与肿瘤的分化程度有关, 提示MIF和VEGF与肿瘤的分化、发展有关, 说明他们能够成为反映恶性肿瘤生物学行为及预后的重要生物学标记物; MIF和IL-8的表达同肿瘤的包膜形成有关, 提示癌细胞MIF和IL-8的表达可能影响了癌细胞间的黏附性, 使癌细胞更加容易相互分离移动, 向周围邻近组织及周围血管侵袭, 促进肿瘤向远处转移或肝内播散. 而且IL-8的表达与肿瘤的大小有关, 说明参与肿瘤的增殖与血管的形成[29].

MIF作用特征之一是在许多生物学现象里呈钟型的剂量依赖曲线, 如抑制巨噬细胞的迁移, 这就说明高低浓度的MIF都可以对细胞的生长起到调节作用. 我们采用不同浓度的MIF对体外培养的肝癌细胞的生长影响进行研究, 结果表明, 低浓度的就可以促进肝癌细胞的生长增殖, 并且随着剂量增加和时间的延长其生长增

**■应用要点**

目前, 针对抑制肿瘤血管新生的药物有许多优点, 如这类制剂作用广泛, 可用于多种肿瘤, 不诱导肿瘤细胞的耐药性, 可多次重复应用, 副作用少等. 因此对抑制生成因子的研究无疑已成为当前研究的新热点. 随着对其的进一步深入研究, 有可能增加肿瘤治疗有效的途径.

■同行评价
作者采用免疫组化法和RQ-PCR检测40例肝癌、癌旁组织和10例正常肝组织中MVD, MIF, IL-8, VEGF蛋白和mRNA表达, 并以MTT法检测rMIF对Bel-7402肝癌细胞株增殖, 以ELISA和RQ-PCR检测VEGF和IL-8的分泌和mRNA表达. 文章科学性、创新性和可读性能较好地反映我国或国际胃肠病学临床和基础研究的水平.

殖逐渐增强, 说明MIF能够促进肿瘤细胞的增殖和生长.

所以有理由推断, 在生长因子诱导细胞增殖的作用中, MIF是生长因子依赖型血管生成的介质, 可能是通过刺激肿瘤细胞分泌VEGF发挥作用. MIF有可能用作肝癌治疗的一种新的靶点.

## 4 参考文献


1 Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{\triangle\triangle Ct}$ method. *Methods* 2001; 25: 402–408

2 Kamimura A, Kamachi M, Nishihira J, Ogura S, Isobe H, Dosaka-Akita H, Ogata A, Shindoh M, Ohbuchi T, Kawakami Y. Intracellular distribution of macrophage migration inhibitory factor predicts the prognosis of patients with adenocarcinoma of the lung. *Cancer* 2000; 89: 334-341

3 del Vecchio MT, Tripodi SA, Arcuri F, Pergola L, Hako L, Vatti R, Cintorino M. Macrophage migration inhibitory factor in prostatic adenocarcinoma: correlation with tumor grading and combination endocrine treatment-related changes. *Prostate* 2000; 45: 51-57

4 Nishihira J, Ishibashi T, Fukushima T, Sun B, Sato Y, Todo S. Macrophage migration inhibitory factor (MIF): Its potential role in tumor growth and tumor-associated angiogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 995: 171-182

5 Meyer-Siegler K, Hudson PB. Enhanced expression of macrophage migration inhibitory factor in prostatic adenocarcinoma metastases. *Urology* 1996; 48: 448-452

6 Meyer-Siegler KL, Iczkowski KA, Vera PL. Further evidence for increased macrophage migration inhibitory factor expression in prostate cancer. *BMC Cancer* 2005; 5: 73

7 Bando H, Matsumoto G, Bando M, Muta M, Ogawa T, Funata N, Nishihira J, Koike M, Toi M. Expression of macrophage migration inhibitory factor in human breast cancer: association with nodal spread. *Jpn J Cancer Res* 2002; 93: 389-396

8 Akbar SM, Abe M, Murakami H, Tanimoto K, Kumagi T, Yamashita Y, Michitaka K, Horiike N, Onji M. Macrophage migration inhibitory factor in hepatocellular carcinoma and liver cirrhosis; relevance to pathogenesis. *Cancer Lett* 2001; 171: 125-132

9 Ren Y, Tsui HT, Poon RT, Ng IO, Li Z, Chen Y, Jiang G, Lau C, Yu WC, Bacher M, Fan ST. Macrophage migration inhibitory factor: roles in regulating tumor cell migration and expression of angiogenic factors in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 2003; 107: 22-29

10 Hudson JD, Shoaibi MA, Maestro R, Carnero A, Hannon GJ, Beach DH. A proinflammatory cytokine inhibits p53 tumor suppressor activity. *J Exp Med* 1999; 190: 1375-1382

11 Hira E, Ono T, Dhar DK, El-Assal ON, Hishikawa Y, Yamanoi A, Nagasue N. Overexpression of macrophage migration inhibitory factor induces angiogenesis and deteriorates prognosis after radical resection for hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2005; 103: 588-598

12 Shun CT, Lin JT, Huang SP, Lin MT, Wu MS. Expression of macrophage migration inhibitory factor is associated with enhanced angiogenesis and advanced stage in gastric carcinomas. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3767-3771

13 An FQ, Matsuda M, Fujii H, Matsumoto Y. Expression of vascular endothelial growth factor in surgical specimens of hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2000; 126: 153-160

14 El-Assal ON, Yamanoi A, Soda Y, Yamaguchi M, Igarashi M, Yamamoto A, Nabika T, Nagasue N. Clinical significance of microvessel density and vascular endothelial growth factor expression in hepatocellular carcinoma and surrounding liver: possible involvement of vascular endothelial growth factor in the angiogenesis of cirrhotic liver. *Hepatology* 1998; 27: 1554-1562

15 Huang GW, Yang LY, Lu WQ. Expression of hypoxia-inducible factor 1alpha and vascular endothelial growth factor in hepatocellular carcinoma: Impact on neovascularization and survival. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1705-1708

16 李立人, 施公胜, 孙超. PCNA和VEGF在肝细胞肝癌中的表达意义. 世界华人消化杂志 2005; 13: 560-561

17 Benoy IH, Salgado R, Van Dam P, Geboers K, Van Marck E, Scharpe S, Vermeulen PB, Dirix LY. Increased serum interleukin-8 in patients with early and metastatic breast cancer correlates with early dissemination and survival. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 7157-7162

18 Kitadai Y, Haruma K, Mukaida N, Ohmoto Y, Matsutani N, Yasui W, Yamamoto S, Sumii K, Kajiyama G, Fidler IJ, Tahara E. Regulation of disease-progression genes in human gastric carcinoma cells by interleukin 8. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 2735-2740

19 Miyamoto M, Shimizu Y, Okada K, Kashii Y, Higuchi K, Watanabe A. Effect of interleukin-8 on production of tumor-associated substances and autocrine growth of human liver and pancreatic cancer cells. *Cancer Immunol Immunother* 1998; 47: 47-57

20 Kubo F, Ueno S, Hiwatashi K, Sakoda M, Kawaida K, Nuruki K, Aikou T. Interleukin 8 in human hepatocellular carcinoma correlates with cancer cell invasion of vessels but not with tumor angiogenesis. *Ann Surg Oncol* 2005; 12: 800-807

21 Ferrer FA, Pantschenko AG, Miller LJ, Anderson K, Grunnet M, McKenna PH, Kreutzer D. Angiogenesis and neuroblastomas: interleukin-8 and interleukin-8 receptor expression in human neuroblastoma. *J Urol* 2000; 164: 1016-1020

22 Heidemann J, Ogawa H, Dwinell MB, Rafiee P, Maaser C, Gockel HR, Otterson MF, Ota DM, Lugering N, Domschke W, Binion DG. Angiogenic effects of interleukin 8 (CXCL8) in human intestinal microvascular endothelial cells are mediated by CXCR2. *J Biol Chem* 2003; 278: 8508-8515

23 Tomiyasu M, Yoshino I, Suemitsu R, Okamoto T, Sugimachi K. Quantification of macrophage migration inhibitory factor mRNA expression in non-small cell lung cancer tissues and its clinical significance. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 3755-3760

24 Akiba J, Yano H, Ogasawara S, Higaki K, Kojiro M. Expression and function of interleukin-8 in human hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol* 2001; 18: 257-264

25 Benedetti S, Erwin G, Meir V. Role of interleukin-8

as a survival factor for cultured endothelial cells. Proceedings of American association of cancer. *Research* 2001; 42: #4
26 Shimizu T, Abe R, Nakamura H, Ohkawara A, Suzuki M, Nishihira J. High expression of macrophage migration inhibitory factor in human melanoma cells and its role in tumor cell growth and angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 264: 751-758
27 Takahashi N, Nishihira J, Sato Y, Kondo M, Ogawa H, Ohshima T, Une Y, Todo S. Involvement of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in the mechanism of tumor cell growth. *Mol Med* 1998; 4: 707-714
28 Chesney J, Metz C, Bacher M, Peng T, Meinhardt A, Bucala R. An essential role for macrophage migration inhibitory factor (MIF) in angiogenesis and the growth of a murine lymphoma. *Mol Med* 1999; 5: 181-191
29 Li A, Dubey S, Varney ML, Dave BJ, Singh RK. IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis. *J Immunol* 2003; 170: 3369-3376

电编 张敏 编辑 潘伯荣

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界胃肠病学杂志社

**• 消息 •**

# 中华医学会第七次全国消化系疾病学术会议征文通知

**本刊讯** 中华医学会消化病学分会定于2007-05上旬在山东省济南市召开第七次全国消化系疾病学术会议. 现将会议的征文内容及有关事项通知如下.

## 1 征文内容

消化系统疾病的流行病学、基础及临床(包括内镜诊断和治疗)研究. 因会议论文交流将按下列组别进行分会场交流, 故务必请在下列8个组别中选择1个您认为适合的交流组别, 并在论文摘要的右下角上标明.(1)功能性胃肠疾病及动力障碍性胃肠病(包括胃食管反流病); (2)幽门螺杆菌及其相关疾病; (3)胰腺疾病; (4)肝胆疾病; (5)胃肠道肿瘤; (6)炎症性疾病; (7)胃肠激素; (8)其他.

## 2 征文要求

请提供800字左右的中文摘要一份, 摘要内容包括: 目的、方法、结果、结论,注明作者的姓名、单位和邮政编码. 并提供电脑打印稿(附软盘), 经所在的单位审查盖章后寄至中华医学会学术会务部刘亚君收(北京东四西大街42号 邮编 100710), 信封上请注明会议名称. 请最好同时通过本次会议专用网站(网址: www.assimilation2007.com)邮寄电子文稿和报名. 凡已在全国性学术会议上或全国公开发行的刊物上发表过的论文, 不予受理. 截稿日期: 2007-02-28(以当地邮戳为准)